

УДК 57.085:634.73

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ЭФФЕКТОВ РАЗНЫХ ИСТОЧНИКОВ ОСВЕЩЕНИЯ НА ИЗМЕНЧИВОСТЬ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ У РЕГЕНЕРАНТОВ СОРТОВОЙ ГОЛУБИКИ ВЫСОКОЙ VACCINIUM CORYMBOSUM L. IN VITRO

А.А. ВОЛОТОВИЧ, О.А. КУДРЯШОВА, А.С. КОХНЮК, Л.С. ЦВИРКО

Полесский государственный университет,
г. Пинск, Республика Беларусь

Введение. Голубика высокая (*Vaccinium corymbosum* L.) – перспективный вид для промышленного культивирования в условиях Республики Беларусь, особенно в южной агроклиматической зоне страны [1].

Процесс клонального микроразмножения растений *in vitro* начинается с этапа введения растений в культуру *in vitro* путем изолирования и стерилизации первичного экспланта с последующим его размещением на стерильной, питательной среде для инициации побегообразования *in vitro* [2].

Основным источником энергии для фотосинтетической и биопродукционной активности высших растений является световая энергия естественного (Солнце), либо искусственных источников освещения. Для физиологических процессов в организме растений наибольшее значение имеет коротковолновая радиация, диапазон которой условно подразделяется на ультрафиолетовую ($\lambda = 0,3 - 0,4$ мкм), видимую ($\lambda = 0,40 - 0,75$ мкм) и близкую инфракрасную ($\lambda_{\text{БИКР1}} = 0,75 - 1,20$ мкм; $\lambda_{\text{БИКР2}} = 1,20 - 4,00$ мкм) области [3].

Область физиологической радиации, поглощаемой пигментами листьев зеленых растений, находится в диапазоне 0,35 – 0,75 мкм и составляет более половины всего излучения Солнца. В пределах физиологической радиации выделяется область фотосинтетически активной радиации (0,38 – 0,71 мкм), имеющая два основных максимума поглощения пигментами листьев зеленых растений в областях 650–670 и 430–480 нм. Воздействие излучения различного спектрального состава и интенсивности фотосинтетически активной радиации (ФАР) на фотосинтез, фотоморфогенез, рост и развитие, другие процессы, определяющие продуктивность растений, достаточно хорошо изучены [3, 4]. Создание новых источников света, для выращивания растений в условиях искусственного освещения усложняется тем, что на фоне различного соотношения синих и зеленых лучей должно быть повышенным содержание красных лучей в спектре ФАР. Эта проблема исчезает с появлением светодиодов, которые открывают неограниченные возможности в области светокультуры растений.

Светодиод (light emitting diode, или LED) – полупроводниковый прибор, преобразующий электрический ток непосредственно в световое излучение практически без потерь и в относительно узкой полосе спектра, ширина которой составляет 20–30 нм [5]. Узкая ширина спектра излучения позволяет использовать светодиоды для формирования светильников со специальным составом спектра, позволяющего активировать фотофизиологические и биопродукционные процессы у растений.

В настоящей статье приведены результаты испытаний созданной нами установки освещения на основе светодиодов, и анализ изменчивости биопродукционных параметров у регенерантов сортов Northland и Brigitta голубики высокой, размножаемых *in vitro*.

Методика и объекты исследования. Исследования проводили на базе биотехнологической лаборатории НИЛ клеточных технологий в растениеводстве УО «Полесский государственный университет» в январе-феврале 2011 года.

В качестве объекта исследований использовали размножаемые *in vitro* регенеранты (экспланты) сортов Northland и Brigitta голубики высокой *V. corymbosum* L., в количестве не менее 120 регенерантов для каждого варианта опыта (из расчета по 40 регенерантов в колбе), в двухкратной повторности. Регенеранты получали в результате культивирования эксплантов (состоящих из двух метамеров) в колбах конических (объемом по 100 мл) с 25 мл стерильной агаризованной, питательной среды на микро-, макро- солевой основе WPM [6], содержащей 5 мг/л 6-(γ , γ -диметилаллиламино)пурина, 1,0 мг/л индолилуксусной кислоты, иные органические соединения – трилон Б, тиамина хлорид, пиридоксина хлорид, никотиновую кислоту, глицин, мезо-инозитол, аденина сульфат, сахарозу – и агар-агар.

Учет анализируемых признаков – высота регенерантов, сырой вес регенерантов, коэффициенты размножения (как количество побегов, формируемых из одного экспланта, и как количество эксплантов, каждый из которых представлен двумя метамерами, полученных из сформированного регенеранта), сырой вес побегов регенеранта (без каллюса), содержание хлорофилла а, b и каротиноидов – проводили через 8 недель культивирования на стеллажах световой установки культурального помещения биотехнологической лаборатории при температуре +25°C, фотопериоде день/ночь – 16ч/8ч, относительной влажности воздуха 70%.

В качестве источников освещения использовали люминесцентные лампы OSRAM L36W/76 Natura (4 лампы – 6000 лк, потребляемая мощность одной лампы – 36 Вт, CCT = 6200–6500 К), либо оригинальные установки освещения на основе светодиодов, представляющие собой надеваемый на колбу пластиковый колпачок со встроенными с внутренней стороны пятью светодиодами (ARL-5213-UVS-λ400 нм; ARL-3014-UWS-λ400 нм; ARL-λ630 нм). Опытные образцы светодиодной установки освещения, сконструированные сотрудниками НИЛ клеточных технологий в растениеводстве в декабре 2010 года, представлены на рисунке. Освещенность из расчета на один опытный образец (5 светодиодов указанной выше маркировки) – около 20000 лк. Предложенный образец установки освещения на основе светодиодов отличается тем, что предназначен для прямого (без потерь) освещения растительного материала *in vitro*. Для сохранения стерильности содержимого колбы, внутренняя часть колпачка со светодиодами перед применением протирается 70%-ным раствором спирта этилового и выдерживается на протяжении 1 часа под ультрафиолетовыми лампами.

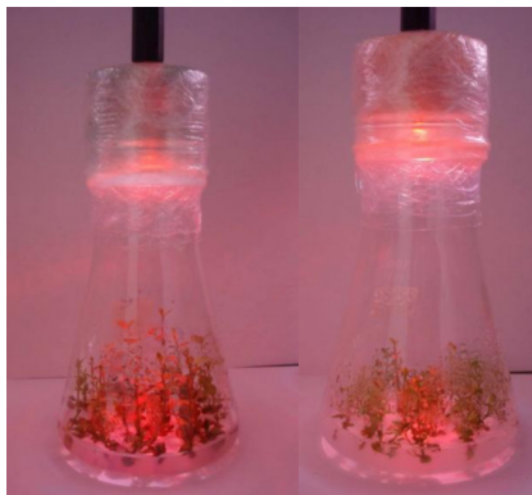


Рисунок – Опытный образец установки освещения на основе светодиодов в действии, слева регенеранты сорта Northland, справа – сорта Brigitta

Содержание фотосинтетических пигментов хлорофилла а, b и каротиноидов в мг на г сырого веса определяли при помощи спектрофотометра Cary 50 (Varian, США) по расчетным формулам [7].

Общий математический анализ данных проводили по стандартным методам вариационной статистики [8], с использованием программы статистического анализа данных STATISTICA 6.0 [9]. Двухфакторный дисперсионный анализ данных и расчет доли влияния факторов на изменчивость исследуемых признаков проводили в программе статистического анализа AB-Stat 1.0, разработанной в Институте генетики и цитологии НАН Беларуси [10].

Результаты и их обсуждение. В таблице 1 приведены результаты изменчивости анализируемых количественных признаков у регенерантов сортов Brigitta и Northland голубики высокой *in vitro*. Для каждого анализируемого сорта, по каждому анализируемому признаку выделены значения, достоверно (при $P < 0,05$ и $P < 0,01$) превышающие соответствующий наименьший показатель по вариантам опыта.

Анализ изменчивости высоты регенерантов указывает на то, что освещение растительного материала обоих исследуемых сортов светодиодами приводит к достоверному (при $P < 0,05$ и $P < 0,01$) увеличению показателей признака в 1,3 раза, по сравнению с показателями данного признака при люминесцентном освещении (табл. 1).

Таблица 1 – Изменчивость количественных признаков у регенерантов сортовой голубики высокой при разных условиях освещения *in vitro*

Сорт	Источник освещения	КРп	ВР, см	КРэ	СВР, г	СВб/к, г	Хл а, мг/г сырого веса	Хл b, мг/г сырого веса	КРН, мг/г сырого веса
Brigitta	ЛЛ	5,32±0,43	1,20±0,05	9,88	0,0413±0,0027	0,0216±0,0018	0,440±0,001	0,120±0,005	0,210±0,005
	С	5,64±0,48	1,60±0,99*	10,30	0,0443±0,0045	0,0243±0,0025	0,720±0,001**	0,230±0,008**	0,290±0,006**
Northland	ЛЛ	1,68±0,13	1,91±0,18	3,36	0,0673±0,0113	0,0452±0,0077	0,150±0,001	0,040±0,001	0,080±0,004
	С	1,76±0,12	2,37±0,13**	4,00	0,0533±0,0062	0,0257±0,0024	0,380±0,001**	0,110±0,002**	0,170±0,004**
НСР _{0,05} (по факторам)		1,27	0,25	-	0,0280	0,0234	0,000	0,001	0,032
НСР _{0,01} (по факторам)		2,33	0,46	-	0,0516	0,0431	0,000	0,003	0,059
НСР _{0,05} (частные средние)		1,79	0,35	-	0,0396	0,0331	0,000	0,002	0,045
НСР _{0,01} (частные средние)		3,29	0,65	-	0,0729	0,0609	0,000	0,005	0,083

Примечание – Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартная ошибка средней; прочерк «-» означает отсутствие данных; * - значимо при $P<0,05$; ** - значимо при $P<0,01$; ЛЛ – лампа люминесцентная OSRAM L 36W/76 Natura; С – светодиоды; ВР – высота регенерантов; КРп – коэффициент размножения, побеги; КРэ – коэффициент размножения, экспланты; СВР – сырой вес регенеранта; СВб/к – сырой вес регенеранта без каллюса; Хл а – хлорофилл а; Хл b – хлорофилл b; КРН – каротиноиды; то же для таблицы 2

Таблица 2 – Двухфакторный дисперсионный анализ изменчивости количественных признаков сортовой голубики высокой при разных условиях освещения *in vitro*

ИВ	df	КРп		ВР		СВР		СВб/к		Хл а		Хл b		КРН	
		СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %	СК	ДВ, %
Общее	7	4,174	-	0,265	-	0,000	-	0,000	-	0,047	-	0,005	-	0,007	-
Фактор А	1	28,163**	96,4	1,535**	82,7	0,001	37,8	0,000	25,1	0,198**	60,0	0,020**	52,9	0,031**	67,1
Фактор В	1	0,074	0,3	0,173*	9,3	0,000	3,7	0,000	11,0	0,130**	39,3	0,016**	42,8	0,014**	31,0
АхВ	1	0,025	0,1	0,024	1,3	0,000	8,9	0,000	19,3	0,001**	0,4	0,001**	2,1	0,001	0,1
Повторности	1	0,006	0,1	0,087	4,7	0,000	21,2	0,000	19,1	0,001	0,2	0,001	2,1	0,001	0,5
Случайные отклонения	3	0,316	3,1	0,012	2,0	0,000	28,4	0,000	25,5	0,001	0,1	0,001	0,1	0,001	1,3

Примечание – Прочерк «-» означает отсутствие данных; ИВ – источник варьирования; СК – средний квадрат; ДВ – доля влияния фактора; фактор А – сорта голубики высокой (Brigitta, Northland); фактор В – тип освещения (люминесцентное, светодиодное)

Установлена также тенденция к увеличению коэффициентов размножения для каждого из исследуемых сортов при освещении светодиодами. При этом количество эксплантов, полученных из сформированного регенеранта у сорта Northland, в 1,2 раза превышало таковое под люминесцентными лампами (табл. 1).

Анализ изменчивости показателей сырого веса у регенерантов не выявил достоверных различий между вариантами опыта. Тем не менее, следует отметить, что в случае сорта Brigitta под светодиодами формировались регенеранты с большей массой (как с каллюсом, так и без него), в то время как в случае сорта Northland регенеранты с большей массой формировались под люминесцентными лампами (табл. 1).

Наиболее существенные, высоко достоверные при $P < 0,01$ различия между вариантами опыта были установлены по содержанию фотосинтетических пигментов – хлорофилла а, хлорофилла b и каротиноидов (табл. 1). Следует отметить, что во всех исследуемых случаях содержание фотосинтетических пигментов у регенерантов, сформированных под светодиодами существенно (для сорта Northland – более чем в 2 раза) превышало таковое у регенерантов под люминесцентными лампами. Так, у сортов Brigitta и Northland превышение по содержанию хлорофилла а составило – 1,64 и 2,53 раза, соответственно; хлорофилла b – в 1,92 и 2,75 раза; каротиноидов – в 1,38 и 2,13 раза, соответственно.

В таблице 2 приведены результаты двухфакторного дисперсионного анализа изменчивости анализируемых признаков.

Установлено, что фактор «сорт» оказывает высоко достоверное (при $P < 0,01$) влияние на изменчивость всех исследуемых признаков, за исключением сырого веса регенерантов, при доле влияния 52,9–96,4 %. Тип освещения (источник света – люминесцентная лампа, либо светодиоды), как фактор, оказывал достоверное влияние на изменчивость высоты регенерантов и содержания фотосинтетических пигментов. Комбинация двух исследуемых факторов оказывала достоверное (при $P < 0,01$) влияние только на изменчивость содержания хлорофиллов а и b (табл. 2).

Выводы. Высота регенерантов обоих исследуемых сортов под светодиодами была достоверно (при $P < 0,05$ и $P < 0,01$) в 1,3 раза выше, по сравнению с высотой регенерантов под люминесцентными лампами.

Установлена тенденция к увеличению коэффициентов размножения для каждого из исследуемых сортов, при освещении регенерантов *in vitro* оригинальной установкой освещения на основе светодиодов.

Анализ изменчивости показателей сырого веса у регенерантов не выявил достоверных различий между вариантами опыта. При этом масса регенерантов сорта Brigitta под светодиодами была выше, а сорта Northland – ниже, по сравнению с массой регенерантов, формируемых при люминесцентном освещении.

У регенерантов исследуемых сортов (Brigitta и Northland) под светодиодами *in vitro* наблюдалось достоверное при $P < 0,01$ превышение по содержанию хлорофиллаа – в 1,64 и 2,53 раза; хлорофилла b – в 1,92 и 2,75 раза; каротиноидов – в 1,38 и 2,13 раза соответственно.

Двухфакторный дисперсионный анализ установил высоко достоверное (при $P < 0,01$) влияние фактора «сорт голубики высокой» на изменчивость всех исследуемых признаков, за исключением сырого веса регенерантов, и фактора «тип освещения» – на изменчивость содержания фотосинтетических пигментов.

Сконструированный и испытанный на базе НИЛ КТР ПолесГУ образец установки освещения на основе светодиодов предлагается для регистрации в качестве полезной модели в Национальном центре интеллектуальной собственности Республики Беларусь.

Авторы выражают благодарность начальнику конструкторского отдела ОАО Пеленг» Кудряшову Александру Алексеевичу за научную идею и помощь в реализации проекта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Рупасова, Ж.А. Голубика высокорослая: оценка адаптационного потенциала при интродукции в условиях Беларуси / Ж.А. Рупасова. – Минск : Беларус. наука, 2007. – 442 с.
2. Сидорович, Е.А. Клональное микроразмножение новых плодово-ягодных растений / Е.А. Сидорович, Е.Н. Кутас. – Минск, 1996. – 246 с.
3. Шульгин, И.А. Растение и солнце / И.А. Шульгин. – Л.: Гидрометиздат, 1973. – 251 с.

4. Тихомиров, А.А. Спектральный состав света и продуктивность растений / А.А. Тихомиров, Г.М. Лисовский, Ф.Я. Сидько. – Нс.: Наука Сиб. Отделение, 1991. – 168 с.
5. Юнович, А.Э. Современное состояние и тенденции развития светодиодов и светодиодного освещения / А.Э. Юнович // Светотехника. – 2007. – №6. – С.13 – 17.
6. Trigiano, R.N. Plant tissue culture concepts and laboratory exercises / R.N. Trigiano, D.J. Gray. – US/MA, CRC Press LLC., 1999–2000. – 454 p.
7. Гавриленко, В.Ф. Большой практикум по фотосинтезу / В.Ф. Гавриленко, Т.В. Жигалова. – М.: Академа, 2003. – 256 с.
8. Доспехов, Б.А. Методика полевого опыта / Б.А. Доспехов. – М.: Агропромиздат, 1985. – 350 с.
9. Боровиков, В.П. STATISTICA : Искусство анализа данных на компьютере / В.П. Боровиков. – Спб : Питер, 2001. – 688 с.
10. Анощенко, Б.Ю. Программы анализа и оптимизации селекционного процесса растений / Б.Ю. Анощенко // Генетика. – М.: Наука, 1994. – Т.30. – Приложение. – С. 8–9.

**ANALYSIS OF VARIABILITY OF QUANTITATIVE TRAITS
AT REGENERANTS OF HIGH-BUSH BLUEBERRY VARIETIES
IN VITRO UNDER DIFFERENT MODE OF LIGHTING**

A.A. VOLOTOVICH, O.A. KUDRYASHOVA, A.S. KAKHNIUK, L.S. TSVIRKO

Summary

There are presented the results of comparative analysis of variability of eight bio-production parameters *in vitro* at Brigitta and Northland high-bush blueberry regenerates under conditions of illumination by luminescent lamps and original device, based on light-emitting diodes. It were observed excess by chlorophyll 'a' maintenance in 1.64 and 2.53 times; by chlorophyll b maintenance – in 1.92 and 2.75 times; by carotenoids – in 1.38 and 2.13 times, accordingly to varieties investigated. The tendency to increase in reproduction factors for each of analyzed varieties is established.

© Волотович А.А., Кудряшова О.А., Кохнюк А.С., Цвирко Л.С.

Поступила в редакцию 14 октября 2011г.